

学位論文題名

Regulatory mechanisms of the predator-induced polyphenism in the water flea (genus *Daphnia*)

(ミジンコにおける捕食者に誘導される表現型多型の制御機構の解析)

学位論文内容の要旨

生物の表現型は遺伝子と環境の相互作用により形成され、同一の遺伝情報からでも異なる表現型を生み出すことが知られる。これは表現型可塑性と呼ばれ、多くの生物で見られる現象である。中でも環境に応じて表現型が不連続に変化する表現型多型は生物が進化の過程で獲得した適応的な表現型可塑性であり、その制御機構の解明は多くの生命現象を理解する上で重要な命題である。またさらには環境要因によって生じる様々な可塑的な表現型が遺伝的に固定されることで生物の多様な形態が生じることから、多様な表現型を生み出す潜在能力は進化の原動力となっていると考えられる。

湖沼に生息する動物プランクトンであるミジンコもこの表現型可塑性を巧みに用いることで繁栄を遂げている生物のひとつである。ミジンコ属 *Daphnia* の多くは捕食者の放出する物質(カイロモン)を感受すると、可塑的に頭部の形態や殻刺の長さを変化させ、防御形態を形成する。これらの防御形態は近縁種間でその形や大きさが様々に異なっており、それぞれの種が異なる環境や捕食者に適応してきた結果であると考えられる。本研究では表現型可塑性の制御機構を明らかにするために、主にミジンコ *D. pulex* を用いてその防御形態形成を司る分子基盤の解析をおこなった。さらに、*D. pulex* で得られた知見に基づいて近縁種間で防御形態形成機構を比較することでその進化過程についても考察した。

Chapter 1

Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*

Daphnia pulex は胚発生期に捕食者であるフサカ *Chaoborus* spp.の放出するカイロモンを感受すると、後胚発生期に後頭部にネックティースと呼ばれるトゲ状の防御形態を形成する。ネックティースの形成過程では、カイロモンの感受機構の下流で内分泌経路を介した形態形成遺伝子の活性化が起こっていると予想されているが、詳細な機構はほとんど分かっていない。第1章ではこのネックティース形成に関与する分子機構を明らかにするために、カイロモン感受期である胚発生期と防御形態形成が起こっている1齢幼生期において、カイロモンに応答して発現量の変化する遺伝子を探索した。節足動物で発生・形態形成への関与が知られている遺伝子群のオルソログを *D. pulex* ゲノムデータベースから取得し、その発現変動を調べた結果、1齢幼生期において、胚発生時の形態形成に関与する転写因子である *Hox3*, *exd*, *esg* や、幼若ホルモン経路に関与する *JHAMT* および *Met*、インスリン経路に関与する *InR* および *IRS-1* の発現量がカイロモンに応答して上昇していた。これらの結果から、防御形態形成時にはカイロモンシグナルの下流で幼若ホルモン経路およびインスリン経路を介して体内生理環境の変化が起こり、初期発生における形態形成カスケードを一部流用することでネックティースの形成へ至るというモ

デルが予想された。またさらに、上記のアプローチでは取得できない未知の遺伝子の関与を調べるために、Differential Display法を用いてカイロモンに応答する遺伝子を網羅的に探索した結果、発現量の上昇する機能未知の3つの遺伝子（DD1、DD2、DD3）を得た。中でも DD1 はカイロモン感受期である胚発生期に防御形態形成に先立って発現上昇がみられたことから、カイロモンの感受とそれによる発生運命の決定に関与していると考えられる。

Chapter 2
Effect of juvenoids on predator-induced polyphenism
in the water flea, *Daphnia pulex*

第1章の結果より、*D. pulex* のネックティース形成への関与が予想される複数の遺伝子や内分泌カスケードが予想された。その中でも幼若ホルモン経路は節足動物において脱皮・変態といった発生イベントを制御しており、表現型多型の制御への関与の例も昆虫類において報告されている非常に重要な内分泌経路である。この幼若ホルモンの合成酵素である *JHAMT* と、受容体候補である *Met* の発現量がともにカイロモンに応じて上昇していることから、防御形態は体内幼若ホルモン濃度の上昇によって引き起こされることが予想された。そこで第2章では胚発生期に幼若ホルモンおよびその類似体を曝露し人為的に体内幼若ホルモン濃度を上昇させることで、*D. pulex* の防御形態形成が体内幼若ホルモン濃度の上昇によって実際に誘導できるかを観察し、防御形態形成における幼若ホルモン経路の役割をより詳細に調べた。その結果、幼若ホルモンの曝露はそれ単体ではネックティースを誘導できなかったものの、カイロモン存在下ではその誘導率を大きく上昇させた。これはネックティース形成が、幼若ホルモン経路単独ではなく、他の因子との協調的作用によって制御されていることを示唆する。またこの際、ネックティースと同様にカイロモンに応じて伸長することが知られている殻刺はカイロモンの有無にかかわらず幼若ホルモン曝露によって短くなったことより、カイロモンによって生じる形態的变化の全てが同じように幼若ホルモンによって制御されているわけではないことも示された。

Chapter 3
Comparison of the regulatory pathways responsible for inducible defense
in the genus *Daphnia*

ミジンコ属の示す多様な防御形態はそれぞれの種が環境に適応してきた結果であると予想されるが、その進化的な背景はよくわかっていない。第3章ではフサカカイロモンに応じて頭部にネックティースとは異なるヘルメットと呼ばれる防御形態を生じる *D. galeata* と *D. ambigua*、および防御形態を生じない *D. magna* の3種のミジンコ属を用いた。第1章と第2章より予想された *D. pulex* のネックティース形成機構がこれらの種でどの程度保存されているかを調べることで、ミジンコ属における防御形態の進化過程の解明を目指した。その結果、ヘルメット形成時には予想されたシグナル経路の上流と下流を司る遺伝子（DD1、DD3）はネックティース形成時と同様にカイロモンに応答して発現量が増加していたが、これらをつなぐ内分泌系と形態形成系に関与する遺伝子の発現量は逆に減少していた。一方で防御形態を生じない *D. magna* ではこれらの遺伝子の発現量は大きな変動はみせなかった。さらに、ネックティース誘導率は幼若ホルモン曝露によって上昇したのに対し、ヘルメット長は幼若ホルモン曝露によって逆に減少した。これらの結果から、ヘルメット形成とネックティースは一部同様の経路の利用が考えられるものの、内分泌系は全く異なる制御をしていることが示唆された。これらの結果とミジンコ属の系統関係から、ネックティースは、*D. pulex* と *D. ambigua* が分かれた後に *D. pulex* のクレードにおいて幼若ホルモン経路の新たな機能の獲得により生じたと予想される。これら本研究の結果より、ミジンコ類が環境に適応した多様な表現型を進化させてきた背景に、既存の制御機構の改変・流用が重要な役割を果たしてきたことが考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	三 浦	徹
副 査	教 授	木 村	正 人
副 査	教 授	大 原	雅
副 査	准教授	梶 内	新 (大学院理学研究院)

学 位 論 文 題 名

Regulatory mechanisms of the predator-induced polyphenism in the water flea (genus *Daphnia*)

(ミジンコにおける捕食者に誘導される表現型多型の制御機構の解析)

生物の表現型は遺伝子と環境の相互作用により形成され、同一の遺伝情報からでも異なる表現型を生み出すことが知られる。これは表現型可塑性と呼ばれ、多くの生物で見られる現象であり、その制御機構の解明は多くの生命現象を理解する上で重要な命題である。またさらには環境要因によって生じる様々な可塑的な表現型が遺伝的に固定されることで生物の多様な形態が生じることから、多様な表現型を生み出す潜在能力は進化の原動力となっていると考えられる。本学位論文で申請者は表現型可塑性の制御機構を明らかにするために、第1章および第2章ではミジンコ *Daphnia. pulex* を用いてその防御形態形成を司る分子基盤の解析をおこない、防御形態形成を制御する分子カスケードを新たに提唱している。さらに第3章では、*D. pulex* で得られた知見に基づいて近縁種間で防御形態形成機構を比較することでその進化過程についてこれまでの先行研究ではなされていない考察を展開している。

D. pulex は胚発生期に捕食者であるフサカ *Chaoborus* spp.の放出するカイロモンを感受すると、後胚発生期に後頭部にネックティースと呼ばれるトゲ状の防御形態を形成する。ネックティースの形成過程では、カイロモンの感受機構の下流で内分泌経路を介した形態形成遺伝子の活性化が起こっていると予想されているが、詳細な機構はほとんど分かっていない。第1章で申請者はこのネックティース形成に関与する分子機構を明らかにするために、カイロモンに応答して発現量の変化する遺伝子を探索し、その結果複数の遺伝子の同定に成功し

ている。さらに、形態形成に関与する転写因子や、幼若ホルモン経路、インスリン経路に関与する遺伝子、および機能未知の新規遺伝子の発現量がカイロモンに応答して上昇したことをもとに、防御形態形成時にはカイロモンシグナルの下流で幼若ホルモン経路およびインスリン経路を介して体内生理環境の変化が起こり、初期発生における形態形成カスケードを一部流用することでネックティースの形成へ至るというモデルを新たに提唱している。

第2章では、幼若ホルモン曝露実験によって、*D. pulex* の防御形態形成における幼若ホルモン経路の役割をより詳細に明らかにしている。幼若ホルモンの曝露はそれ単体ではネックティースを誘導できなかったものの、カイロモン存在下ではその誘導率を大きく上昇させることから、ネックティース形成における幼若ホルモン経路と他の因子の協調的作用の示唆を得ている。またこの際、殻刺はカイロモンの有無にかかわらず幼若ホルモン曝露によって短くなることを発見し、カイロモンによって生じる形態的变化の全てが同じように幼若ホルモンによって制御されているわけではないことも明らかにしている。

ミジンコ属の示す多様な防御形態はそれぞれの種が環境に適応してきた結果であると予想されるが、その進化的な背景はよくわかっていない。第3章で申請者はヘルメットと呼ばれる防御形態を生じる *D. galeata* と *D. ambigua*、および防御形態を生じない *D. magna* の3種のミジンコ属において、第1章と第2章より予想された *D. pulex* の防御形態形成機構が一部保存されていることを明らかにし、ミジンコ属における防御形態の進化過程に関する新たな知見を得ることに成功している。申請者は、内分泌系と形態形成系に関与する遺伝子の発現量がヘルメット形成時には *D. pulex* のネックティース形成時と逆に減少する一方で、防御形態を生じない *D. magna* ではこれらの遺伝子の発現量は大きな変動をみせないことを明らかにしている。さらに、ヘルメット長が幼若ホルモン曝露によって減少することも発見し、ヘルメット形成とネックティース形成において内分泌系全く異なる制御をしていることを示唆している。これらの結果とミジンコ属の系統関係から、ネックティースは、*D. pulex* と *D. ambigua* が分かれた後に *D. pulex* のクレードにおいて幼若ホルモン経路の新たな機能の獲得により生じたという新しい仮説を提唱している。

これら本研究の結果より、ミジンコ類が環境に適応した多様な表現型を進化させてきた背景に、既存の制御機構の改変・流用が重要な役割を果たしてきたことが示唆され、ミジンコ類に限らず生物全般に共通する表現型の進化の理解にこの研究が大きく貢献したと言える。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。